

PROCESS FOR OBTAINING A POLYHYDROXYALKANOATE FROM THE CELL MATERIAL OF A MICROORGANISM

Patent Number: ☒ [US5213976](#)
Publication date: 1993-05-25
Inventor(s): BLAUHUT WILFRIED [AT]; GIERLINGER WOLFGANG [AT]; STREMPFL FRIEDRICH [AT]
Applicant(s): DANUBIA PETROCHEM POLYMERE [AT]
Requested Patent: ☒ [JP4264125](#)
Application number: US19910761244 19910917
Priority Number(s): AT19900002018 19901005
IPC Classification: C12N1/06; C12P7/62; C07L69/66
C Classification: [C12P7/62A](#)
Equivalents: AT201890, ☒ [AT395319B](#), DE59106857D, DK479043T, ☒ [EP0479043](#), B1, ES2078406T, GR3018034T

Abstract

Process for extracting polyhydroxyalkanoates from the cell material of microorganisms by adding an organic solvent for the polyhydroxyalkanoate which is immiscible with water and which has a boiling point of below 100 DEG C., and, if appropriate, by adding water; stirring the resulting extraction mixture, if appropriate with refluxing; separating off the aqueous phase which contains the cell material in undissolved form from the organic phase; and injecting the organic phase into hot water, causing the dissolved polyhydroxyalkanoate to precipitate and the organic solvent to evaporate, and also isolating the precipitated polyhydroxyalkanoate flocs.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-264125

(43)公開日 平成4年(1992)9月18日

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 G 63/02	M L P	7211-4 J.		
C 1 2 P 7/62		8114-4 B		

審査請求 未請求 請求項の数2(全 4 頁)

(21)出願番号	特願平3-258101	(71)出願人	591220104 ペー・ツエー・デー・ポリメレ・ゲゼルシ ヤフト・ミト・ベシユレンクテル・ハフツ ング オーストリア国、シユウエハトーマンスウ エルト、ダヌビアストラーセ、21-25
(22)出願日	平成3年(1991)10月4日	(72)発明者	ウイルフリート・ブラウフート オーストリア国、リンツ、バツハルベルク ウエーク、75
(31)優先権主張番号	A 2018/90	(72)発明者	ウオルフガング・ギールリンゲル オーストリア国、リンツ、エドムントーア イグネルストラーセ、31
(32)優先日	1990年10月5日	(74)代理人	弁理士 江崎 光史 (外3名)
(33)優先権主張国	オーストリア (A T)		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物の細胞材料からポリヒドロキシアルカノアートを得る方法、およびポリヒドロキシアルカノアートブロック

(57)【要約】

【構成】 水に混和しないそして100℃未満の沸点を有するポリヒドロキシアルカノアート用有機溶剤を添加することによりそして、場合により、水を添加し、結果として得られる抽出混合物を、場合により還流しながら攪拌し、細胞材料を溶解していない形で含む水性相を有機相から分離し、そして有機相を熱水に注入し、溶解したポリヒドロキシアルカノアートを沈澱させそして有機溶剤を蒸発させることにより微生物の細胞原料からポリヒドロキシアルカノアートを抽出する。

【効果】 細胞を解体する必要がなくそして細胞残渣をいかなる複雑な手順をも伴わずにかつ困難なしに除去でき、その際、ポリヒドロキシアルカノアートが同時に、処理が容易でありかつ対象物にさらに加工するのに驚くほど十分に適しているブロックの形で単離される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 発酵溶液のまたは発酵溶液の中に含まれる水の少なくとも一部を細胞サスペンションから除去し、細胞材料を、水を添加してまたは添加せずに、水と混和しないそして100℃未満の沸点を有するポリヒドロキシアлкаノアート用有機溶剤で処理し、形成される抽出混合物を、室温から有機溶剤の沸点までの温度で攪拌しそして、遠心分離してまたはせずに沈降させ、水性相および有機相を形成し、ポリヒドロキシアлкаノアートを溶解した形で含む有機相を、細胞残渣を溶解していない形で含む水性相から分離し、有機相を、有機溶剤の沸点よりも高い温度で熱水に注入し、有機溶剤を蒸発させそしてポリヒドロキシアлкаノアートを水中で沈降させ、その際後者は通例の方法で得られることを特徴とする、発酵した、水性の細胞サスペンションの細胞材料から、微生物により細胞内で合成されたポリヒドロキシアлкаノアートを得る方法。

【請求項2】 フロックの形にあるポリヒドロキシアлкаノアート。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細胞材料から、微生物により細胞内で合成されたポリヒドロキシアлкаノアート(polyhydroxyalkanoates)を得る方法、およびポリヒドロキシアлкаノアートフロックに関する。

【0002】

【従来の技術】 ポリヒドロキシアлкаノアート、特にD-(-)-3-ヒドロキシ酪酸(ポリ-HB)のホモポリマーおよびコポリマーは、多くの微生物によってエネルギーおよび炭素の貯蔵物質として細胞内で合成されそして蓄積され、そしてそれらは熱可塑性を有するそして生物分解性であるポリエステルの一例である。ポリ-HBは、微生物を用いて、例えば米国特許第4,786,598号または米国特許第4,957,861号に記載の方法に従って、良好な収率で製造されることができ。ポリ-HBのコポリエステル、例えば、3-ヒドロキシ酪酸単位および3-ヒドロキシ吉草酸単位または、代わりに、別の酸単位からなるコポリエステルは、発酵を通して、例えばヨーロッパ特許公開第0052459号、ヨーロッパ特許公開第0204442号、ヨーロッパ特許公開第0288908号、ヨーロッパ特許公開第0304293号またはヨーロッパ特許公開第0274151号に記載された方法の1つにより、製造されることができ。形成されたポリヒドロキシアлкаノアートは微生物の細胞材料に組み込まれておりそして細胞材料から分離されなければならないが、これは比較的困難である。分離の可能な1つの方法は、溶剤を用いた抽出であるが、今日までのところ開示された方法を行うことは、同様に困難を引き起こす。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 例えば、微生物の細胞材料に組み込まれたポリヒドロキシアлкаノアートを、溶剤の作用をより容易に受け入れるようにするためには、実際の抽出工程の上流に、細胞材料を解体するかまたは可溶性にするための分離工程を提供することが必要である。例えば、米国特許第3,044,942号は、アセトンを用いた細胞の前処理を開示し、米国特許第3,275,610号は、細胞を打ち砕くかまたは細胞を堅い物体と共に振り混ぜることによる細胞の機械的前処理を開示し、ヨーロッパ特許公開第0,015,123号、ヨーロッパ特許公開第0,124,309号またはヨーロッパ特許公開第0,168,095号は、微生物の細胞を別の方法で、例えば水を共沸蒸留により除去することにより、噴霧乾燥または前乾燥することを開示しており、そしてヨーロッパ特許公開第0,015,669号は、浸透圧ショック、超音波または細胞壁の溶解による細胞の前処理を開示している。さらに、この方法で前処理した溶解していない細胞材料を、溶解したポリヒドロキシアлкаノアートから分離することは、大きい問題を提示する。なぜならば、溶解していない細胞材料は、ゼリー様物質としてフィルターを詰まらせ、そして細胞材料から全ての有機相を取り除くことが非常に困難であるからである。これが、ヨーロッパ特許出願公開第0046017号が、より良好な分離能を与えるための、結合したアルカリ、酸および熱処理を用いた抽出前の細胞材料のプロキュレーションを開示する理由であり、一方CA Vol. 108, 1988, Ref. 73835jは、細胞材料を溶剤から分離するために、濾過助剤、例えばパーライトまたはけい酸土を用いることを提案している。

【0004】

【課題を解決するための手段】 驚くべきことに、今や、細胞を解体する必要がなくそして細胞残渣をいかなる複雑な手順をも伴わずにかつ困難なしに除去でき、その際、ポリヒドロキシアлкаノアートが同時に、処理が容易でありかつ対象物にさらに加工するのに驚くほど十分に適しているフロックの形で単離される、簡単な方法が見出された。

【0005】 それ故本発明は、発酵溶液のまたは発酵溶液の中に含まれる水の少なくとも一部を細胞サスペンションから除去し、細胞材料を、水を添加してまたは添加せずに、水と混和しないそして100℃未満の沸点を有するポリヒドロキシアлкаノアート用有機溶剤で処理し、その結果として形成される抽出混合物を、室温から有機溶剤の沸点までの温度で攪拌しそして、遠心分離してまたはせずに沈降させ、水性相および有機相を形成し、ポリヒドロキシアлкаノアートを溶解した形で含む有機相を、細胞残渣を溶解していない形で含む水性相から分離し、有機相を、有機溶剤の沸点よりも高い温度で熱水に注入し、有機溶剤を蒸発させそしてポリヒドロキシアлкаノアートを水中で沈降させ、その際後者は通例

3

の方法で得られることを特徴とする、発酵した、水性の細胞サスペンションの細胞材料から、微生物により細胞内で合成されたポリヒドロキシアルカノアートを得る方法に関する。

【0006】本発明による方法を行うために、まず、発酵溶液のまたはその水の少なくとも一部を、発酵した水性の細胞サスペンションから除去する。ここで使用できる分離方法の例は、発酵溶液からの細胞材料のデカンテーション、遠心分離および濾過であり、または発酵溶液の中に含まれる水の少なくとも一部は蒸留により除去される。遠心分離により、好ましく分離器を用いて、細胞材料から発酵溶液の一部を除去するのが好ましい。これは、細胞サスペンションの濃度を上げ、このことは、当該方法の残りのために重要である。

【0007】本発明による方法の利点の1つは、細胞材料を、それを解体するかまたは乾燥することにより前処理する必要がないことである。しかしながら、前処理した細胞材料を本発明による方法において用いることも可能である。

【0008】好ましくは水を含む細胞材料、または濃縮された細胞サスペンションを、水と混和しないそして水の沸点よりも低い沸点を有するポリヒドロキシアルカノアート用有機溶剤で処理する。適当な溶剤の例は、ハロゲン化炭化水素、例えば塩化メチレン、クロロホルムまたはトリクロロエチレンである。塩化メチレンを使用するのが好ましい。細胞材料、有機溶剤および水の間の最適な比率を形成するより後の段階での最適な相分離に非常に重要であるので、必要に応じて、水を、細胞材料および有機溶剤の混合物に同様に添加する。

【0009】添加後に、細胞乾燥重量に対する細胞材料：水：溶剤の重量比が約2：1：10～1：10：100、特に好ましくは約2：3：20～1：5：50、非常に特に好ましくは約1：3：20になるような量の有機溶剤とこのような量の水を添加するのが好ましい。

【0010】細胞材料、ポリヒドロキシアルカノアート用有機溶剤および水の混合物を室温から使用した溶剤の沸点までの温度で激しく攪拌する。この混合物を好ましくは、相の激しい混合を可能にするミキサーを用いて、例えば静的(static)ミキサーまたは動的(dynamic)高速攪拌機を用いて、細胞材料からポリヒドロキシアルカノアートをできるだけ完全に溶解するように、攪拌するのが好ましい。高速攪拌機を用いた場合、溶剤の加熱は不要である。なぜならば、ポリヒドロキシアルカノアートは室温ですら細胞材料からほとんど完全に溶解されるからである。徹底的な混合後および、必要に応じて冷却後、当該混合物を静止させるかまたは遠心分離機にかけ、その際水性相および有機相が形成される。この方法において相分離が容易にされるので、混合物を遠心分離するのが好ましい。この後、水性相は不溶性の細胞残渣を含み、そして有機相は溶解したポリヒドロキシアルカ

4

ノアートを含む。有機相が水性相から簡単な相分離によって分離されるので、細胞材料を除去するために、濾過は不要であり、その際細胞残渣は水性相の中に残る。得られた有機溶液は濁っているかもしれない。濁りの除去のため、有機溶液を、深床フィルターに、例えば砂床に、通すことができる。

【0011】続いて、分離したそしてポリヒドロキシアルカノアートを溶解した形で含む有機相を、予め容器に投入されている熱水に注入する。予め投入した水の温度は、有機溶剤の沸点より高くそして水の沸点よりも低くなければならない、それを圧力下に最初に投入することもできる。有機相を注入するために、全ての適当なノズル、例えば適当なデザインの一構成または二構成ノズルが使用できる。有機相を二構成ノズルを用いて、推進薬として蒸気を用いて、熱水に注入するのが有利である。有機溶剤を最初に投入した熱水と接触させるやいなや、有機溶剤は蒸発しそしてポリヒドロキシアルカノアートは最初に投入した水の中でフロックの形で沈殿する。

【0012】最初に投入した熱水は、有機溶剤の蒸発により冷却されるので、水の容器を、例えば加熱用マントルを用いて、加熱し、そしてほぼ一定の温度で維持するのが有利であり、そして、蒸気を推進薬として使用する場合、溶剤の蒸発熱の少なくとも一部は、推進蒸気の凝縮熱により供給される。

【0013】最初に投入する熱水の量は、本方法の成功にとって臨界的でない。しかしながら、受け器の内容物の簡単な攪拌が、沈殿するポリヒドロキシアルカノアートの沈降を妨げるような量の水を投入するのが有利である。これは、通常、なお約3%のポリヒドロキシアルカノアート濃度での場合である。有効な蒸気圧に従って蒸発した有機溶剤および同伴した蒸気が慣用の方法で水容器の外で凝縮する。凝縮した水は直接水容器に再循環されることができ、そして有機溶剤は請求項1による方法に再利用されることができる。

【0014】次に、沈殿したポリヒドロキシアルカノアートフロックを、有機溶剤をできるだけ完全に駆逐するように熱水中で15～60分間、好ましくは20～40分間攪拌し、続いてフロックを水から適当な方法、例えば濾過、吸引濾過または遠心分離により、好ましくは遠心分離により分離し、そして適当な方法で60～110℃で、例えば減圧下に乾燥またはトレイ乾燥器中での乾燥により、分離する。

【0015】結果として得られるポリヒドロキシアルカノアートフロックは顕著な方法で処理され得る。なぜならば、これらのフロックは、実質的にダストを含まずそしてバルク材料に良好に貫流できるからである。フロックの形のポリヒドロキシアルカノアートは新規でありそして本発明の対象でもある。この方法は連続的にまたは回分式に行われることができるが、好ましくは連続的に行われる。

【0016】好適な実施態様において、ポリ-HBを含む細胞材料を発酵溶液から遠心分離により分離し、次いで、細胞乾燥重量に対する細胞材料：水：塩化メチレンの重量比が約1：3：10～1：5：30になるような量の塩化メチレンおよび、必要に応じてこのような量の水を細胞材料に添加する。続いて、結果として得られる混合物を10～60分間攪拌しながら還流するかまたは室温で動的な高速攪拌機を用いて攪拌し、そして、必要であれば、冷却しそして遠心分離し、この方法において、細胞残渣を不溶性の形で含む水性相が生じそしてポリ-HBを溶解した形で含む有機相が形成される。メチレンクロリド相を、水性相から回収しそして、蒸気を用いて、水が70～90℃の温度で投入されている加熱した容器に、攪拌しながら注入する。それによって水中に凝集するポリ-HBを熱水中で20～40分間攪拌し、遠心機を用いて分離しそしてトレー乾燥器中で80～100℃で乾燥する。

【0017】

【発明の効果】本発明による方法によって得られるポリヒドロキシアルカノアートは、思いがけなく容易に対象物に加工され得る。例えば、射出成形はポリプロピレンの場合とほぼ同一の繰り返し周期を与える。ポリヒドロキシアルカノアートはポリプロピレンよりもゆっくりと結晶することが知られているので、このことは専門家にとってまったく驚くべきことである。

【0018】上述したように、ポリヒドロキシアルカノアートは微生物の細胞材料から良好な収量でかつ簡単な方法で分離され、その際、ポリヒドロキシアルカノアートは、処理し易いそして加工し易いブロックの形で得られる。それ故、本法は、当該技術の強化を意味する。

【0019】

【実施例】実施例1

ヨーロッパ特許公開第0,144,017号に記載された方法によって得られそして発酵溶液の一部を固体放出を伴うディスクセパレーターを用いて遠心分離すること

により除去した後の、72重量%のポリ-HB含有率を持つアルカリゲネス・ラツス (*Alcaligenes latus*)の細胞材料26重量%を含む発酵水溶液60lを水30lおよび塩化メチレン400lで処理しそして30分間攪拌しながら還流した。結果として得られた混合物を2200rpmで630mmのドラム直径を有するサイホン遠心機中で遠心分離し、その間に、微生物の細胞材料を溶解していない形で含む水性相およびポリ-HBを溶解した形で含む有機相が形成された。

10 【0020】底部の有機相を、上部の水性相から回収しそして攪拌した容器に投入されていた温度80℃の水800lに、PHB溶液用の直径4mmの穴および推進薬、すなわち蒸気用の約2mmの環状のギャップ幅を有する二構成ノズルを用いて、進入圧力3barで、300l/hの容積蒸気を用いて注入する。この工程の間、水の温度は、容器を取り囲む加熱ジャケットを用いてほぼ一定に維持された。この工程の間に、ポリ-HBはフロックの形で沈殿し、一方塩化メチレンおよび少量の水が蒸発しそして容器の外で凝縮されそして集められた。

20 注入が終わった後、このサスペンションを30分間80℃で攪拌した。続いて容器の内容物を、630mmのドラム直径を有するトレーリングブレード遠心機にポンプで送り込み、遠心分離速度2000rpmで水および遠心含水ポリ-HBフロックに分離した。遠心含水フロックを24時間トレー乾燥器中で80℃で乾燥した。

【0021】これは、9.5kgのポリ-HBを与えた。これは理論量の85%であり、>99%の純度そして<1ppmの塩化メチレン含有率である。

【0022】実施例2

30 実施例1に記載した発酵水溶液50mlを水20mlおよび塩化メチレン350mlで処理し、そしてこの混合物を2時間室温で、ドイツのIKA, Maschinenbau, Janke & Kunke GmbHにより製造されたUltra Turrax高速攪拌機を用いて攪拌した。この方法において、細胞材料中に存在するポリ-HB97重量%が溶解した。

フロントページの続き

(72)発明者 フリードリツヒ・シュトレムプフル
オーストリア国、リンツ、フランクストラ
ーセ、26